

CHIMIOTAXINOMIE DES BOLETS DE LA SECTION *LURIDI*

C. ANDARY¹, L. COSSON¹, M.J. BOURRIER², R. WYLDE³ et A. HEITZ³

- 1- Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de pharmacie, 34060 Montpellier.
- 2- Laboratoire Interrégional, Service de la Répression des Fraudes, 34000 Montpellier.
- 3- Centre CNRS - INSERM, Pharmacologie - Endocrinologie, Faculté de Pharmacie, 34060 Montpellier.

RÉSUMÉ - L'isolement de deux diastéréoisomères de l'acide 2-amino-4-hydroxy-pentanoïque dont la structure a été vérifiée par RMN, permet de proposer la création de deux sous-sections *Luridus* et *Satanas*, homogènes, ■ sein de la section *Luridi* génératrice de nombreuses polémiques taxinomiques et toxicologiques.

ABSTRACT - Isolation and structural verification of two diastereomers of 2-amino-4-hydroxypentanoic acid allowed to propose the creation of two sub-sections *Luridus* and *Satanas*, in the *Luridi* section responsible of many nomenclatural and toxicologic discussions.

MOTS CLÉS : *Boletus*, section *Luridi*, sous-sections *Luridus* et *Satanas*, acide 2-amino-4-hydroxypentanoïque, chimiotaxinomie.

Parmi les champignons supérieurs, les bolets occupent une place privilégiée en ce qui concerne leurs qualités gustatives.

Le "cèpe de Bordeaux" (*Boletus edulis* Bull.: Fr.) est l'espèce la plus connue et la plus recherchée. D'autres espèces cependant sont excellentes et appréciées des connaisseurs tels certains bolets à pores rouges pour la plupart, souvent bleuissants et classés dans la section *Luridi*. Nous citerons en particulier *B. erythropus* et *B. luridus*. Il faut toutefois les consommer à l'état cuit et être sûr de leur détermination. Celle-ci est justement fort délicate car les espèces de cette section sont très nombreuses et leurs caractères morphologiques voisins. Leur classification est controversée et leur comestibilité est de ce fait mal connue. Or dans cette section *Luridi* se trouvent les seuls bolets responsables d'intoxication, non mortelle certes, mais à l'origine des troubles digestifs les plus sévères, même cuits (Singer, 1986; Andary, 1987). Parmi ces dernières espèces, *B. satanas* est l'espèce la plus incriminée. A l'état cuit, elle ne semble cependant pas provoquer d'intoxication. Elle est reconnaissable à son chapeau très pâle presque blanc, pratiquement jamais taché de rose. Cependant, des formes moins typiques peuvent être à l'origine de confusions et d'intoxications.

Il est donc essentiel de disposer de marqueurs chimiques caractéristiques en vue d'assurer une identification rapide et sûre et d'établir une classification précise. Au cours d'une étude préliminaire, nous avons mis au point une

méthode d'analyse des acides aminés libres par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle (CCM 2D) et leur dosage par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (Andary et al., 1988). Nous rapportons ici les résultats de l'analyse d'un certain nombre de taxons appartenant à la section *Luridi* ainsi que l'identification d'un acide aminé rare et non protéique présent dans certaines espèces sous la forme de deux stéréoisomères.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Espèces étudiées et conditions chromatographiques

Tous les échantillons de bolets (correspondant à un échantillon représentatif du carpophore) ont été déshydratés à 45° et réduits en poudre pour l'analyse chimique. Les différents spécimens sont conservés dans l'herbier du laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie. (Tabl. I).

Les analyses des acides aminés libres par CCM et leur dosage par CLHP ont été réalisés selon la méthode déjà décrite (Andary et al., 1988).

• Les solvants utilisés sont les suivants:

- CCM 2D de cellulose
 - S1: Butanol-acétone-diéthylamine-eau (10:10:2:5 v/v)
 - S2: Isopropanol/acide formique/eau (40:2:10 v/v)
- CCM de gel de silice:
 - S3: Chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (65:24:4:4,5 v/v)
- Chromatographie sur colonne de cellulose:
 - S4: Ethanol/propanol/eau (30:40:30 v/v)
 - S5: Méthanol/acétone/ammoniaque/eau (10:10:0,5:5 v/v)
 - S6: Méthanol/eau (90:10 v/v)
 - S7: Ethanol/propanol/eau (40:40:40 v/v)
- Chromatographie sur colonne de gel de silice:
 - S8: Chloroforme/méthanol/eau (65:25:4 v/v)

• La révélation après migration dans les solvants utilisés se fait par vaporisation d'un réactif polychromatique à la ninhydrine (Andary et al., 1988).

Obtention et purification des deux isomères X3 et X4

L'extraction et la purification sont effectuées selon le protocole précédemment publié à partir de 80 g de poudre de *B. pulchrotinctus*; ce qui nous a permis d'obtenir le "pool" des acides aminés libres du champignon. Ce "pool" concentré à sec et repris dans 5 ml de solvant S4 est chromatographié sur une première colonne de cellulose avec ce même solvant. La purification des composés X3 et X4 se fait par passages successifs sur des colonnes de cellulose et élution par des solvants appropriés (Fig. 1).

Analyse et structure de X3 et X4

• Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été réalisés à 360 MHz pour le ¹H et 90,53 MHz pour le ¹³C (Appareil Bruker WM 360 WB). Les déplacements chimiques sont donnés en δ (ppm) avec comme étalon interne le TMS.

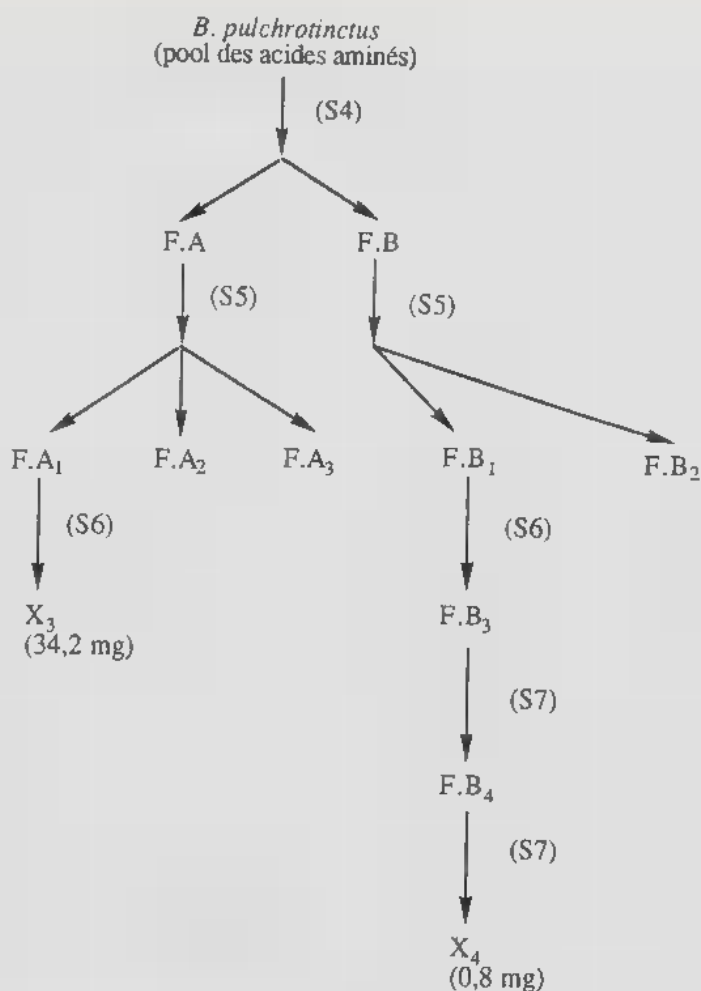


Figure 1: Schéma d'extraction et de purification des molécules X3 et X4 par chromatographie sur colonne de cellulose (S4...S7 = phases mobiles utilisées; F.A, F.B... = fractions collectées).

Figure 1: Extraction and purification diagram of X3 and X4 compounds by cellulose columns chromatography. (S4... S7 = mobil phases used; F.A, F.B... = collected fractions).

• Dégradation acide de X3

La dégradation acide de X3 se fait directement sur chromatoplaque de gel de silice en présence d'acide chlorhydrique 2N à 100°C.

Le composé obtenu nommé Y est révélé par vaporisation du réactif à la ninhydrine après migration dans le solvant S7. Ce composé Y est isolé par chromatographie sur une colonne de gel de silice et élution par S8.

ESPECES	N° D'HERBIER	LIEU DE RECOLTE	DATE DE RECOLTE
■ <i>dupainii</i> Boudier	AND 8309-1	Bédarieux (34)	13/09/1983
<i>B. erythropus</i> Pers.	RAP 8811-27 AND 8709-14 BOU 8609-12	Aigoual (30) La Bastide de Langogne (48) Valleraugue (30)	01/11/1988 13/09/1987
<i>B. junquilleus</i> (Quéf.) Boud.	COU 8110-01	Fline les Mortagne (59)	13/10/1981
<i>B. legaliae</i> (Pilât) ex Pilât ■ Dermek	RED 13411 P	Pouvrai (61)	1981
<i>B. lupinus</i> Fr.	RAP 8610-15 BOU 8810-17 BER 8510-19	Nîmes (30) Pic St Loup (34) Quissac (30)	02/10/1986 24/10/1988 29/10/1985
<i>B. luridus</i> Schaeff. : Fr.	AND 8811-23 BER 8410-10 ■ 8510-18	Aigoual (30) Bédarieux (34) Aigoual (30)	13/11/1988 20/10/1984 28/10/1985
<i>B. luteocupreus</i> Bertea et Estades	MAU 8811-22 AND 8709-12 GUI 8610-83G	Cazeville (34) Pyrénées Orientales (66) Saulaie de Léognan La Brède (33)	01/11/1988 13/09/1987 11/10/1986
<i>B. permagnificus</i> Pöder	POD 8210-31	?	31/10/1982
<i>B. pulchrotinctus</i> Alessio	BER 8609-11 AND 8810-21 BER 8809-20	Quissac (30) Montarnaud (34) Quissac (30)	28/09/1986 25/10/1988 28/09/1988
■ <i>queletii</i> Schulz.	BOU 8810-24 BER 8510-08	Pic St Loup (34) Quissac (30)	24/10/1988 29/10/1985
<i>B. rhodopurpureus</i> Smotl.	AND 8707-26 RED 14911 P	Aigoual (30) Bellon (16)	23/07/1987 03/08/1983
<i>B. rhodoxanthus</i> (Krombh.) Kallenb.	BOU 8610-16 PRI 8810-28	Cornus (12) Aigoual (30)	13/10/1986 24/10/1988
<i>B. rubrosanguineus</i> (Waltz) ex Cheyfe	RED 14171 P	Champagnole (39)	20/08/1982
<i>B. satanas</i> Lenz	RAP 8710-13 CHE 8609-14 CHE 8610-18	Pic St Loup (34) Montarnaud (34) Nîmes (30)	26/10/1987 01/09/1986 02/10/1986
<i>B. torosus</i> Fr.	BON 8110-03 RED 183 P	Fline les Mortagne (59) Chizé (79)	18/10/1981 05/08/1987

Tableau I: Espèces analysées (genre *Bolenus*, section *Luridi*)Table I: Analysed species (*Bolenus*, *Luridi* section)

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Analyse des acides aminés libres

Par CCM 2D, nous avons pu identifier, à partir de 15 espèces appartenant toutes à la section *Luridi* 15 acides aminés libres usuels et distinguer 3 acides aminés que nous avons nommés X3, X4 et X5 et qui ne correspondaient à aucun des 35 acides aminés que nous pouvions identifier (Andary et al., 1988). X3 et X4 apparaissent chez certaines espèces seulement et X5 permet une distinction rapide entre *B. satanas* (ne contenant pas ce composé) et *B.*

pulchrotinctus, espèce de création récente, controversée par certains mycologues et contenant cette molécule X5. Toutefois les concentrations observées sont faibles et ce dernier produit n'a pas été identifié. Pour l'extraction et l'étude des molécules X3 et X4, notre choix s'est porté sur *B. pulchrotinctus* qui représentait une matière première abondante à notre disposition.

L'analyse par CLHP aboutit à l'identification et au dosage de 25 composés révélés par la ninhydrine (acides aminés et composés apparentés). Nous confirmons la présence de concentrations élevées d'alanine, d'acide glutamique, de glutamine et d'acide γ -aminobutyrique dans toutes les espèces étudiées. Le composé X3, pour les espèces qui en contiennent, correspond à la molécule la plus concentrée parmi celles révélées par la ninhydrine. Ainsi on trouve jusqu'à 6 mg/g environ de X3 pour *B. rhodoxanthus* alors que la glutamine et l'alanine sont respectivement de 3,48 et 2,9 mg/g pour le même champignon. X3 est toujours plus abondant que X4 (Tabl. II). Au cours de

Acides aminés libres et apparentés en mg/g de champignon sec	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	dupai.	eryt.	lega.	lupi.	luri.	pulc.	quel.	mod.	luteo.	rhox.	rubr.	B. ■	B. ■	toro.	
Ac. aspartique	-	0,234	0,090	0,182	0,368	0,096	0,068	0,104	0,066	0,418	0,078	0,444	0,086		
Thréonine	0,226	0,398	0,196	0,456	0,932	0,238	0,238	0,034	0,096	0,716	0,256	0,438	0,064		
Sérine	0,508	0,814	0,244	0,864	2,376	0,578	0,388	0,142	0,186	1,438	0,486	0,534	0,186		
Asparagine	0,502	-	-	-	-	-	0,248	-	-	-	-	-	-		
Ac. glutamique	0,904	1,016	1,080	1,120	2,060	0,648	0,962	0,206	0,376	1,928	1,016	2,802	0,058		
Glutamine	0,754	1,816	0,382	0,474	4,810	0,586	0,338	0,276	0,320	3,480	-	2,370	-		
X ₃	-	-	1,638	1,482	-	3,344	-	-	-	6,518	2,892	5,268	-		
X ₄	-	-	1,318	0,550	-	0,306	-	-	-	1,206	0,876	2,994	-		
Glycocolle	0,036	0,698	0,264	1,814	0,968	0,442	0,120	0,598	0,056	1,684	0,392	0,528	0,074		
Alanine	1,054	1,714	0,820	1,640	3,618	1,904	1,022	1,714	0,878	2,986	0,786	2,556	0,516		
Valine	0,114	0,242	0,062	0,230	0,344	0,110	0,140	0,242	0,020	0,288	0,156	0,240	-		
Méthionine	-	0,022	-	-	-	0,020	0,010	0,022	0,016	-	-	-	-		
Cystéionine	0,030	-	-	-	-	0,030	0,040	-	0,014	-	-	-	-		
Isoleucine	0,024	-	0,036	0,108	-	-	0,070	-	0,020	0,104	0,060	0,264	0,018		
Leucine	0,010	0,074	0,030	0,144	0,216	-	0,060	0,074	0,008	0,108	-	0,060	0,022		
Tyrosine	0,014	-	-	-	0,208	-	0,118	-	-	0,210	-	-	-		
β -alanine	0,028	-	-	-	-	-	0,044	-	-	-	-	-	-		
Phénylalanine	-	0,102	-	-	-	-	0,058	0,102	-	-	-	-	-		
Ac. β -N-butynque	-	-	-	-	-	-	0,128	-	-	-	-	-	-		
Ac. γ -N-butynque	0,704	1,988	0,906	0,516	2,282	1,016	0,664	1,532	1,154	1,138	3,668	1,812	0,162		
Ammoniaque	0,186	0,124	1,126	0,176	0,578	0,210	0,278	0,008	0,176	0,386	1,244	0,612	0,708		
Ornithine	0,308	0,408	0,202	0,402	0,280	0,638	0,060	0,068	0,116	1,424	0,162	0,528	0,160		
Lysine	0,078	-	0,208	0,138	-	0,176	0,072	-	-	0,538	0,178	0,180	0,072		
Histidine	0,022	-	0,030	-	-	0,022	0,056	-	0,030	0,212	-	0,102	-		
Arginine	0,040	-	0,124	0,122	-	0,228	0,070	0,066	0,182	0,220	0,530	0,726	0,124		
Total en mg/g Champ. ■	5,542	8,950	8,756	10,420	18,980	10,582	5,272	5,208	3,514	24,982	12,780	22,458	2,250		

* avec des traces de proline

dupai. : *dupainii* ; eryt. : *erythropus* ; lega. : *legaliae* ; lupi. : *lupinus* ; luri. : *luridus* ; pulc. : *pulchrotinctus* ; quel. : *queletii* ; rhod. : *rhodopurpureus* ; luteo. : *luteocupreus* ; rhox. : *rhodoxanthus* ; rubr. : *rubrosanguineus* ; sata. : *satanas* ; toro. : *torosus*.

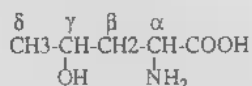
Tableau II: Dosage des acides aminés et apparentés libres (en mg/g de champignon sec) réalisé par C.I.H.P. chez des bolets de la section *Luridi*.

Table II: Concentration of free amino-acids and related compounds (in mg/g dried mushrooms) by HPLC in Boletes of *Luridi* section.

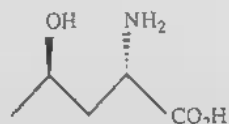
ces analyses, nous avons constaté que la concentration en acides aminés était plus élevée dans l'hyménophore que dans les autres organes (stipe et pileus).

Isolément et identification de X3 et X4

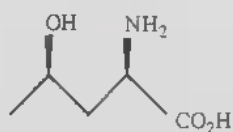
Nous avons obtenu au total 34,2 mg de X3 et 0,8 mg de X4. L'analyse des spectres de RMN a permis la détermination de la structure de ces deux composés (Tabl. III et IV). Ce sont deux diastéréoisomères de l'acide 2-amino-4-hydroxypentanoïque appelé également γ -hydroxynorvaline de formule brute: $C_5H_{11}NO_3$ et de formule développée:



Le composé X3 correspond à la forme thréo (2S, 4R)-(-)-2-amino-4-hydroxypentanoïque de formule:



X4 correspond à la forme erythro (2S, 4S)-(+)-2-amino-4-hydroxypentanoïque de formule:



Ces deux isomères avaient été isolés chez *B. satanas* par Matzinger et al. (1972) puis synthétisés par Harding et al. (1988). Par dégradation acide réalisée directement sur plaque de gel de silice nous obtenons, à partir de l'isomère (2S, 4R), un composé Y se colorant en jaune vif en présence du révélateur à base de ninhydrine. Puis cette couleur évolue au bout de quelques minutes vers le brun

[†] H	X3	X4
H α	3,49 (dd;4,4;6,3)	3,85 (dd;4,9;8,8)
H β	2,02 (m)	2,14 (ddd;15,1;3,4;4,9) 1,83 (ddd;15,1;9,3;8,8)
H γ	4,03 (qdd;4,4;6,0;8,3)	4,11 (qdd;3,4;6,0;9,3)
H δ	1,27 (d;6,0)	1,28 (d;6,0)

Tableau III: Spectre de RMN ^1H (ppm) de X₃ et X₄ dissous dans le DMSO-d₆. Les déplacements chimiques et les valeurs de *J* sont données entre parenthèses.

Table III: ^1H NMR spectra (ppm) of X₃ and X₄ dissolved in DMSO-d₆. Chemical shifts and *J* values are in parentheses.

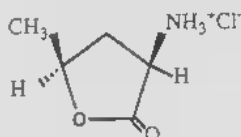
^{13}C	X3
C α	51,0
C β	35,5
C γ	63,0
C δ	20,5
C'	172,4

Tableau IV: Spectres de RMN ^{13}C (ppm) de X₃ dissous dans le DMSO-d₆.

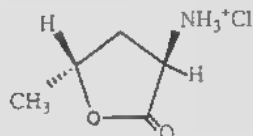
Table IV: ^{13}C NMR spectra (ppm) of X₃ dissolved in DMSO-d₆.

violacé. Les deux isomères (2S, 4R) et (2S, 4S) se dégradent totalement au bout de 15 mn de chauffage. Le dérivé Y possède les mêmes caractéristiques physico-chimiques que la lactone isolée par Matzinger et al. (1972).

Une dégradation des deux diastéréoisomères en milieu liquide est également réalisée à 37°C en milieu HCl 0,01N (pH 2) dans le but de reproduire des conditions analogues à celles de l'estomac. Dans ces conditions, l'hydrolyse débute après 15 mn. Au cours de cette dégradation acide, il se produit une cyclodéshydratation de la molécule donnant un chlorhydrate d'ammine sous la forme de dérivés cis et trans de formules suivantes:



Dérivé cis obtenu par cyclodéshydratation du composé thréo (2S, 4R)(= Y)



Dérivé trans obtenu par cyclodéshydratation du composé erythro (2S, 4S)

Activité de l'acide 2-amino-4-hydroxypentanoïque

a) Rôle toxique?

La consommation de deux carpophores et demi de *B. pulchrotinctus* (parfaitement déterminés) a nécessité l'hospitalisation pendant une nuit de la personne concernée. Ces champignons avaient été cuits à l'eau, pendant 15 à 20 mn; cette eau avait été rejetée. Trois heures environ après le repas (pris à 20h30), cette personne a présenté des nausées et vomissements importants, des tremblements et des sueurs froides, suivis de diarrhées le lendemain. Le rétablissement nécessita environ 48 heures (Andary, 1987).

Nous avons eu la possibilité de tester l'éventuelle toxicité des molécules isolées vis-à-vis de lymphocytes humains *in vitro* (travail réalisé au Laboratoire d'Immunologie cellulaire, Hôpital St Eloi, Montpellier). Aucune toxicité n'a été mise en évidence pour cet acide ou sa lactone par rapport aux contrôles et ceci pour des dilutions allant de 10^{-2} à 10^{-7} M. Cependant, une absence de

cytotoxicité vis-à-vis des lymphocytes humains n'exclut pas un pouvoir toxique vis-à-vis d'autres cellules. Le rôle de ces acides aminés non protéiques, isolés à partir de plantes supérieures ou de champignons, est peu connu. Certains sont des précurseurs dans la synthèse d'acides aminés essentiels (Bell, 1980), d'autres ont des propriétés antimétaboliques (Hatanaka et al., 1985).

On connaît effectivement des acides aminés non protéiques toxiques chez certaines amanites tels l'acide L-2-amino-4,5-hexadiénoïque et l'acide L-2-amino-4-pentynoïque antimétaboliques et hépatotoxiques. Ces molécules furent isolées de carpophores d'*Amanita solitaria* (Fr.) Secr. (combinaison valide: *A. strobiliformis* (Vitt.) Bertillon), *A. abrupta* Peck, *A. pseudoporphyria* Hongo et *A. neoovoides* Hongo (Chilton & Ott, 1976; Hatanaka & Kawasaki, 1980; Hatanaka et al. 1985; Yamaura et al., 1986).

La présence d'acides aminés très souvent hydroxylés constitutifs de polypeptides toxiques tels que les amanitines et les phalloïdines est à signaler. C'est le cas de l'acide (2S, 3R, 4S)-2-amino-3-méthyl-4-hydroxyvalérique constitutif de la γ -amanitine ainsi que de l'acide (2S, 4R)-2-amino-3-méthyl-4,5-dihydroxyvalérique intervenant dans la structure des α et β amanitines (Gieren et al., 1974). La perte du groupement hydroxylé de l'hydroxyleucine chez les amanitines et de celui de l'hydroxyproline chez la phalloïne diminue fortement la toxicité de ces molécules (Wieland & Faulstich, 1978).

On trouve également un acide aminé insaturé: la vinyglycine chez *Entoloma nidorosum* (Fr.) Qué. considéré comme suspect (Dardenne et al., 1974), ainsi que chez *E. lividum* (Bull.) Qué. fortement toxique. La responsabilité de cet acide aminé dans la toxicité n'a pas été prouvée.

Le rôle de l'acide L-2-amino-4-méthyl-hex-5-énoïque isolé à partir d'un bolet de Nouvelle-Guinée (Gellert et al., 1973), présumé responsable de troubles hallucinogènes, n'a pas été non plus étudié.

b) Valeur chimiotaxinomique

Nous avons recherché, d'une façon systématique et selon les échantillons disponibles, la présence de ces isomères de l'acide 2-amino-4-hydroxypentanoïque chez le maximum d'espèces. Nous avons utilisé les premiers travaux réalisés (Andary et al., 1988) en les complétant par l'étude de nouvelles espèces (Cosson, 1989). Sur les 26 taxons analysés, appartenant à différents genres chez les Bolétales, nous retrouvons les isomères thréo et érythro uniquement dans un groupe d'espèces homogènes et appartenant toutes à la section *Luridi* (Tabl. V).

Cette constatation est très intéressante car les espèces citées contenant ces composés correspondent exactement aux espèces toxiques ou suspectes parmi les bolets. Nous pouvons supposer que ces deux acides aminés jouent un rôle dans les désordres gastro-intestinaux parfois assez graves entraînés par l'ingestion de ces champignons. Or, les espèces de cette section, longtemps mal connues parce que irrégulièrement réparties en Europe, semblent être mieux comprises actuellement. L'analyse des acides aminés de ces champignons par CCM 2D et par CLHP nous permet d'être plus précis dans l'étude taxinomique de ces espèces.

Ainsi, *B. rubrosanguineus* (Walty) ex Cheype a été synonymisé à *B. rhodopurpureus* Smotlacha par Charbonnel (1980) et Engel (1983). Par la suite, en 1991, Alessio réhabilite *B. rubrosanguineus* comme espèce à part entière. Nous pouvons confirmer cette distinction car les exemplaires de *B.*

GENRE	SECTION	ESPECE	X3	X4
Boletus	<i>Appendiculati</i>	<i>appendiculatus</i>	-	-
	<i>Boletus</i>	<i>edulis</i>	-	-
	<i>Calopodes</i>	<i>calopus</i>	-	-
		<i>albidus</i>	-	-
	<i>Luridi</i>	<i>dupainii</i>	-	-
		<i>erythropus</i>	-	-
		<i>jonquilleus</i>	-	-
		<i>legaliae</i>	+	+
		<i>lupinus</i>	+	+
		<i>luridus</i>	-	-
		<i>luteocupreus</i>	-	-
		<i>permagnificus</i>	-	-
		<i>pulchrotinctus</i>	+	+
		<i>queletii</i>	-	-
		<i>rhodopurpureus</i>	-	-
		<i>rhodoxanthus</i>	+	+
		<i>rubrosanguineus</i>	+	+
<i>satanas</i>	+	+		
<i>torosus</i>	-	-		
<i>Boletinus</i>		<i>cavipes</i>	-	-
<i>Krombholziella</i>	<i>Scabrae</i>	<i>duriusculus</i>	-	-
<i>Suillus</i>	<i>Suilli</i>	<i>collinitus</i>	-	-
		<i>luteus</i>	-	-
	<i>Fungosi</i>	<i>variegatus</i>	-	-
		<i>bovinus</i>	-	-
<i>Xerocomus</i>		<i>chrysenteron</i>	-	-

Tableau V: Recherche des acides aminés X₃ et X₄ chez différentes espèces de bolets.Table V: Amino-acids X₃ and X₄ research in varied species of Boletes.

rhodopurpureus analysés ne contiennent pas X₃ et X₄ alors que ces deux isomères sont présents chez *B. rubrosanguineus*. Ce fait est en accord avec l'avis de Cheype (1982) et Redeuilh (1988).

Pour ce dernier, *B. rubrosanguineus* correspond en fait à un taxon nommé B, issu de *B. splendidus* Martìn, espèce des montagnes. L'autre taxon A, espèce de la plaine sous feuillus, correspond toujours pour Redeuilh (1988) à *B. legaliae* (Pilát) ex Pilát et Dermek. Ceci est en accord avec l'analyse chimique car nous avons retrouvé X₃ et X₄ dans *B. legaliae* également.

Charbonnel (1981) rassemble trois espèces dans le groupe *rhodoxanthus*: "*B. purpureus* Fr. sens. Romagnesi; *B. rhodoxanthus* Kall. et *B. rhodopurpureus* Smol.". Il synonymise "*B. purpureus* Fr. sens. Romagnesi à *B. lupinus* Fr. sens. Bresadola, *B. legaliae* Pilát et Dermek et *B. satanoides* Smol.". Ce regroupement et ces synonymies sont en désaccord avec nos résultats car *B. rhodoxanthus* est très distinctement séparé par la présence de X₃ et X₄, absents chez *B. rhodopurpureus* et *B. luteocupreus* (= *B. purpureus pro parte*) (Bertea & Estades, 1990).

Il est admis actuellement (P. Berteau communication personnelle) que le nom de *purpureus* a été cité dans des sens très différents par de nombreux auteurs et, en l'absence d'un contexte descriptif suffisamment discriminant, il ne devrait plus être utilisé.

B. rhodoxanthus, qui possède X3 et X4, est peu controversé. Seul Bon (1988) en fait une variété de *B. rhodopurpureus* Smotl., ce qui nous semble peu probable puisque ce dernier ne contient pas les marqueurs X3 et X4.

Alessio (1985) distingue deux grands groupes dans la section *Luridi*: le groupe a à réseau marqué et le groupe ■ n'ayant pas de réseau net.

Le groupe a est divisé en un sous-groupe a1 comprenant des espèces à chapeau de coloration marquée: de jaune vif à brun rouge. Le sous-groupe a2 regroupe des espèces à chapeau beaucoup plus clair, ne s'assombrissant qu'après le stade de maturité.

On retrouve dans ce sous-groupe a2: "*B. rhodoxanthus* (Krombh.) Kall., *B. splendidus* Martin, *B. pulchrotinctus* Alessio et *B. satanas* Lenz" qui correspondent aux espèces contenant X3 et X4. Alessio ne reconnaît pas *B. legaliae* car il l'inclut dans la synonymie de *B. splendidus* (mais nous avons vu que l'analyse chimique confirme les conclusions récentes de Redeuilh (1988) à ce sujet). Il ne manque dans ce sous-groupe a2 que *B. lupinus* classé par Alessio dans le groupe b.

La solution proposée par Bon (1988) est intéressante à ce sujet. Ce dernier constitue deux sections:

section *Luridi* comprenant: "*B. luridus* Schaeff.: Fr., *B. erythropus* Pers.: Fr., *B. dupainii* Boud., *B. queletii* Schulz.;"

section *Purpurei* regroupant: "*B. rhodopurpureus* Smot., *B. legaliae* Pil., *B. rhodoxanthus* (Krb.) ex Kallenb., *B. lupinus* Fr., et *B. satanas* Lenz".

B. lupinus se retrouve donc dans la même section que *B. satanas* et *B. legaliae*, ce qui est en accord avec nos résultats biochimiques.

Enfin le découpage préconisé par Cheype (1982) est également à retenir. Il distingue d'une part:

"*B. torosus* (Fr.), *B. xanthocyaneus* (Romain) Romagn. et *B. rhodopurpureus* Smotl. (= *B. purpureus* (Fr.) sens. Peltreau);"

d'autre part:

"*B. satanoides* Smotl. (= *B. legaliae* (Pilât) = *B. lupinus* sens. Bres.), *B. rhodoxanthus* (Krombh.) et *B. rubrosanguineus* (Walty)". Nous avons pu vérifier que seul le deuxième groupe contient X3 et X4.

Ainsi, la synthèse de toutes ces constatations, de ces classements et notre analyse chimique dans la section *Luridi* nous a amené à proposer dans cette section deux sous-sections, que nous avons appelées *Luridus* et *Satanas* (Tabl. VI). Cette dernière comprend les espèces caractérisées chimiquement par la présence de X3 et X4 et correspondent aux espèces toxiques. Il est intéressant de noter que ces conclusions rejoignent totalement les conceptions taxinomiques actuelles de la plupart des spécialistes des bolets.

SOUS-SECTION <i>LURIDUS</i>	SOUS-SECTION <i>SATANAS</i>
<i>B. dupainii</i> Boudier <i>B. erythropus</i> Pers. <i>B. junquilleus</i> (Quél.) Boud. ■ <i>luridus</i> Schaeff.: Fr. <i>B. luteocupreus</i> Berteau et Estades <i>B. permagnificus</i> Pöder <i>B. queletii</i> Schulz. <i>B. rhodopurpureus</i> Smotl. <i>B. torosus</i> Fr.	<i>B. legaliae</i> (Pilát) ex Pilát et Dermek <i>B. lupinus</i> Fr. <i>B. pulchrotinctus</i> Alessio <i>B. rhodoxanthus</i> (Krombh.) Kallenb. <i>B. rubrosanguineus</i> (Walty) ex Cheype <i>B. satanas</i> Lenz

Tableau VI: Nouvelles sous-sections de la section *Luridi*.Table VI: New sub-sections of *Luridi* section.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Mme M. Andary pour les tests de toxicité lymphocytaire, ainsi que MM M. Bon, G. Chevassut, J.L. Cheype, R. Courtccuisse, J. Guinberteau, R. Pöder et G. Redeuilh qui ont eu l'amabilité de nous fournir des exsiccata. Nous remercions tout particulièrement P. Berteau pour ses conseils pertinents et la relecture du mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- ALESSIO C. L., 1985 - *Boletus* Dill. ex L. Saronno, Biella Giovanna, *Fungi Europaei* 2: 712 p.
- ALESSIO C.L., 1991 - *Boletus* (suppléments). Saronno, Biella Giovanna, *Fungi Europaei* 2a: 126 p.
- ANDARY C., 1987 - Cas d'intoxication par *B. pulchrotinctus*. Hospitalisation de P.D. Centre Anti-poisons de Montpellier (Dr. Passeron, service de réanimation).
- ANDARY C., BOURRIER M.J. et HAUPERT R., 1988 - Rôle des polyols et des acides aminés dans la différenciation des Bolets. *Cryptogamie, Mycol.* 9: 277-288.
- BELL E.A., 1980 - Non protein amino-acids in plants. In: D. H. Heg. et D. J. John, *International review of science, organic chemistry*. London, Butterworths, serie 1, 6: 1-16.
- BERTEAU P. et ESTADES A., 1990 - *Boletus luteocupreus*. *Bull. Féd. Mycol. Dauphiné-Savoie* 118: 25-31.
- BON M., 1988 - *Champignons d'Europe occidentale*. Arthaud, 368 p.
- CHARBONNEL J., 1980 - Les Bolets du groupe *purpureus*. *Soc. Mycol. Rém.* 1: 13-17.
- CHARBONNEL J., 1981 - Les Bolets du groupe *purpureus*. *Soc. Mycol. Rém.* 2: 16-24.
- CHEYPE J.L., 1982 - Bolets du groupe *purpureus*: clé analytique provisoire. *Bull. Féd. Mycol. Dauphiné-Savoie* 84: 12-24.
- CHILTON WS. and OTT J., 1976 - Toxic metabolites of *Amanita pantherina*, *A. cothurnata*, *A. muscaria* and other *Amanita* species. *Lloydia* 39: 150-156.

- COSSON L., 1989 - Etude de marqueurs spécifiques du genre *Boletus*, section *Luridi*. Isolement et identification. DEA Sciences des aliments, nutrition, fermentation, Univ. Montpellier I, 58 p.
- DARDENNE G., CASIMIR J., MARLIER M. et LARSEN P.O., 1974 - Acide 2 (R)-amino-3-butenoïque (vinylglycine) dans les carpophores de *Rhodophyllus nidorosus*. *Phytochemistry* 13: 1897-1900.
- ENGEL H., KRIEGLSTEINER G.J., DERMEK A. und WATLING R., 1983 - Dickröhrlinge. Die gattung *Boletus* in Europa: Engel Heinz, Schneider-Druck, Weidhausen, 157 p.
- GELLERT E., HALPERN B. and RUDZATS R., 1973 - Amino acids and steroids of a New Guinea *Boletus*. *Phytochemistry* 12: 689-692.
- GIEREN A., NARAYANAN P., HOPPE W., HASAN M., MICHL K., WIELAND Th., SMITH H., JUNG G. und BREITMAIER E., 1974 - Die Konfiguration der hydroxylierten Isoleucine der Amatoxine. *Liebigs Ann. Chem.* 44: 1561-1569.
- HARDING K.E., MARMAN T.H. and NAM D.K. 1988 - Stereoslective synthesis of (±) erythro and threo γ -hydroxynorvaline. *Tetrahedron Lett.* 29: 1627-1630.
- HATANAKA S.I. and KAWAKAMI K., 1980 - Biochemical studies on nitrogen compounds of fungi. XIX - Isolation and identification of L-2-Amino-4, 5-hexadenoic acid from *A. neoovoidea* Hongo. *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo* 30: 147-150.
- HATANAKA S.I., NIIMURA Y. and TAKISHIMA K., 1985 - Non-protein amino-acids of unsaturated norleucine-type in *Amanita pseudoporphyria*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 26: 61-68.
- MATZINGER P., CATAFOLMO Ph. et EUGSTER C.H., 1972 - Isolierung von (2S, 4S)-(-)- γ hydroxynorvalin und (2S, 4S)-(-)- γ hydroxynorvalin aus *Boletus satanas* Lenz. *Helv. Chim. Acta* 55: 1478-1490.
- REDEUILH G. , 1988 - Etude nomenclaturale sur les bolets. II - Critique nomenclaturale des noms de bolets in "*Boletus*" (Fungi Europaei) par C.L. Alessio, Saronno 1985. *Doc. Mycol.* 18 (72): 28-39.
- SINGER R., 1986 - The Agaricales in Modern taxonomy, 4ème éd., Koenigstein, Koeltz Scientific Books, 981 p.
- WIELAND T. and FAULSTICH H., 1978 - Amatoxines, phallotoxines, phallolysine and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC, Crit. Rev. Biochem.* 5: 185-260.
- YAMAURA Y., FUKUHARA M., TAKABATAKE E., ITO N. and HASHIMOTO T., 1986 - Hepatotoxic action of ■ poisoning mushroom, *Amanita abrupta* in mice and its toxic component. *Toxicology* 38: 161-173.